



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013132670/10, 15.07.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.07.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.07.2013

(43) Дата публикации заявки: 20.01.2015 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 20.02.2015 Бюл. № 5

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2397243 C1, 20.08.2010.

МАЛЫШЕВА Н.Н., МАТТЕРН А.И.

Электроактивные нанокомпозиты для
иммуноанализа на основе Fe₃O₄.Достижения в химии и химической
технологии: тр. науч. конф. Екатеринбург,
2011, с.75-79 (с.75 абз.1 снизу, с.76-78, с.79
абз.2 снизу). PADMAVATHY TALLURY,
ASTHA MALHOTRA et al. Nanobioimaging
and sensing of infectious diseases. // (см. прод.)

Адрес для переписки:

620002, г.Екатеринбург, К-2, ул. Мира, 19, УрФУ,
центр интеллектуальной собственности, Марк
Татьяне Владимировне

(72) Автор(ы):

Козицина Алиса Николаевна (RU),
Малышева Наталья Николаевна (RU),
Глазырина Юлия Александровна (RU),
Матерн Анатолий Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования "Уральский
федеральный университет имени первого
Президента России Б.Н. Ельцина" (RU)(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ПАТОГЕННЫХ
БАКТЕРИЙ В АНАЛИЗИРУЕМОЙ СРЕДЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к электрохимическим методам анализа, а именно к иммуноанализу, в частности к определению содержания патогенных микроорганизмов в различных объектах и средах. Изобретение может быть использовано в микробиологии, медицине, экологии для мониторинга содержания микроорганизмов в природных объектах и дифференциальной диагностики инфекционных заболеваний. Электрохимический способ определения содержания грамотрицательных патогенных бактерий предполагает использование в качестве сигналообразующей метки электроактивных магнитных нанокомпозитных частиц, которые

перед стадией конъюгирования получают путем создания на поверхности магнитных наночастиц переходных металлов или их соединений электроактивного полимерного покрытия. Концентрацию патогенных микроорганизмов определяют путем получения электрохимического отклика, регистрируемого напрямую в результате электропревращения электроактивного полимерного покрытия. Изобретение направлено на упрощение анализа, увеличение чувствительности, экспрессности, воспроизводимости, а также на расширение круга электрохимически активных меток. Использование полимерного покрытия позволяет

добиться высокой чувствительности и воспроизводимости анализа. 7 ил. 6 пр.

(56) (продолжение):

Advanced Drug Delivery Reviews, 62 (2010), pp.424-437 (см. abstract, p.426, 431, 433). HAILAN LIN, QINGZHU LU et al. Detection of pathogen Escherichia coli O157:H7 with a wireless magnetoelastic-sensing device amplified by using chitosan-modified magnetic Fe₃O₄ nanoparticles. Sensors and Actuators B, 2010, V.147, p.343-349

R U
2 5 4 2 4 8 7
C 2

R U
2 5 4 2 4 8 7
C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 542 487** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

C12Q 1/04 (2006.01)

C12N 1/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

B82B 1/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2013132670/10, 15.07.2013

(24) Effective date for property rights:
15.07.2013

Priority:

(22) Date of filing: 15.07.2013

(43) Application published: 20.01.2015 Bull. № 2

(45) Date of publication: 20.02.2015 Bull. № 5

Mail address:

620002, g.Ekaterinburg, K-2, ul. Mira, 19, UrFU,
tsentr intellektual'noj sobstvennosti, Marks Tat'jane
Vladimirovne

(72) Inventor(s):

Kozitsina Alisa Nikolaevna (RU),
Malysheva Natal'ja Nikolaevna (RU),
Glazyrina Julija Aleksandrovna (RU),
Matern Anatolij Ivanovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego
professional'nogo obrazovanija "Ural'skij
federal'nyj universitet imeni pervogo Prezidenta
Rossii B.N. El'tsina" (RU)

(54) METHOD FOR DETERMINATION OF GRAM-NEGATIVE PATHOGENIC BACTERIA IN ANALYSED MEDIUM

(57) Abstract:

FIELD: electricity.

SUBSTANCE: electrochemical method for determination of gram-negative pathogenic bacteria in analysed medium suggests using as signal tag of electroactive magnet nanocomposite particles, which are produced before conjugation stage by creation of transition metals or their compounds for electroactive polymer coating on the surface of magnet nanoparticles. Concentration of pathogenic microorganisms is defined

by electrochemical response registered directly in result of conversion of electroactive polymer coating.

EFFECT: analysis simplification, increased sensitivity, rapidness, reproducibility, widening the range of electrochemically active tags, using of polymer coating allows reaching high sensitivity and reproducibility of the analysis.

7 dwg, 6 ex

Изобретение относится к электрохимическим методам анализа, а именно к иммуноанализу, в частности к определению содержания патогенных микроорганизмов в различных объектах и средах. Изобретение может быть использовано в микробиологии, медицине, экологии для мониторинга содержания патогенных микроорганизмов в природных объектах и дифференциальной диагностики инфекционных заболеваний.

Недостатками используемых в настоящее время методов являются: низкая чувствительность (реакции агглютинации), высокая стоимость используемых реагентов и оборудования (иммуноферментный анализ), необходимость создания специальных условий (метод анализа, основанный на полимеразной цепной реакции) и длительность проведения анализа (бактериальный посев).

Для мониторинга колиформных бактерий, продуцирующих в результате своей жизнедеятельности фенол, предлагают использовать амперометрический тирозиназный сенсор и аминомодифицированный магнетит, осажденный на углеродных нанотрубках. Эту систему используют для детектирования фенола. Тирозиназа катализирует окисление фенольных соединений в присутствии кислорода с получением о-хинонов, которые могут быть восстановлены электрохимически при низких потенциалах без медиаторов. Однако в данном методе требуется ≈ 4 часа для предварительной активации β -D-галактрозидазы и другие длительные подготовительные процедуры. Отсутствие специфичности реакции также является недостатком данного метода (Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe_3O_4 nanoparticles-coated carbon nanotubes nanocomposite for rapid detection of coliforms/Yuxiao Cheng, Yajun Liu, Jingjing Huang et al//Electrochimica Acta, 2009, V.54, P.2588-2594).

Предложен метод обнаружения бактерий E.Coli при помощи кварцевого сенсора с использованием наночастиц магнетита, покрытых декстраном, и наночастиц золота, покрытых стрептавидином. Данный метод до момента непосредственного детектирования включает в себя 7 предварительных стадий (таких как инкубирование, сепарирование, декантирование). Помимо значительного увеличения продолжительности анализа, все эти стадии вносят огромный вклад в погрешность измерения (QCM immunosensor detection of Escherichia coli O157:H7 based on beacon immunomagnetic nanoparticles and catalytic growth of colloidal gold/Zhi-Qiang Shen, Jing-Feng Wang, Zhi-Gang Qiu et al//Biosensors and Bioelectronics, 2011, V.26, P.3376-3381).

Также для детектирования бактерий E.Coli предложено использовать магнитоэластичный сенсор, модифицированный полиуретаном и наночастицы магнетита модифицированные хитозаном. Подготовленный сенсор помещается в кювету с суспензией магнетита, модифицированного хитозаном, и E.Coli. Затем вся система помещается в катушку соленоида, от которой получают сигнал. Измеряется резонансная частота сенсора. При pH 5-6.5 бактерии электростатически притягиваются к наночастицам, затем наночастицы примагничиваются к сенсору, уменьшая его резонансную частоту. Однако данный метод также лишен специфичности (Detection of pathogen Escherichia coli O157:H7 with a wireless magnetoelastic-sensing device amplified by using chitosan-modified magnetic Fe_3O_4 nanoparticles/Hailan Lin, Qingzhu Lu, Shutian Ge, Qingyun Cai et al//Sensors and Actuators B, 2010, V.147, P.343-349).

Наиболее близким техническим решением, выбранным в качестве прототипа, служит способ определения патогенных микроорганизмов, включающий конъюгацию патогенного микроорганизма с магнитными наночастицами в анализируемой среде с последующим концентрированием конъюгатов и определением наличия и концентрации патогенных микроорганизмов с помощью электроактивной сигналообразующей метки.

В качестве магнитных наночастиц и, одновременно, электроактивной сигналообразующей метки авторы использовали наночастицы переходного металла. Перед концентрированием меченых конъюгатов наночастицы, несвязанные с патогенными микроорганизмами, выводили из анализируемой среды. Концентрирование меченого конъюгата осуществляли путем формирования на электроде иммунокомплекса «меченный магнитной меткой патогенный микроорганизм - антитело» с последующим изъятием иммунокомплекса из среды на электроде. Далее проводили кислотную обработку электрода, содержащего меченый иммунокомплекс. Определение наличия и концентрации патогенных микроорганизмов осуществляли по сигналу, генерируемому ионами переходного металла, получаемых путем кислотного разрушения иммунокомплекса (Патент РФ №2397243 от 20.08.2010).

К недостаткам данного способа следует отнести многостадийность процесса анализа, низкий предел обнаружения, высокую трудоемкость процесса, большие временные затраты, а также высокие требования к квалификации операторов.

Предлагаемое техническое решение направлено на упрощение анализа, увеличение чувствительности, экспрессности, воспроизводимости, а также на расширение круга электрохимически активных меток.

Указанный технический эффект достигается тем, что предлагаемый способ электрохимического иммуноанализа включает в себя конъюгацию патогенных микроорганизмов с электроактивными магнитными нанокompозитными частицами, магнитную сепарацию с последующим концентрированием конъюгатов и определением наличия и концентрации патогенных микроорганизмов с помощью сигналообразующей метки, локализованной путем образования иммунокомплекса на поверхности электрода, в качестве которой выступают электроактивные магнитные нанокompозитные частицы. Концентрацию патогенных микроорганизмов определяют путем получения прямого электрохимического отклика от электроактивных магнитных нанокompозитных частиц, регистрируемого в результате электрохимического превращения электроактивного полимерного покрытия (полимерного покрытия, модифицированного электроактивными соединениями) наночастиц.

Указанные отличительные признаки существенны. Получение электрохимического отклика от метки в результате разряда непосредственно электроактивного полимерного покрытия (полимерного покрытия, модифицированного электроактивными соединениями) электроактивных магнитных нанокompозитных частиц позволит исключить из процедуры иммуноанализа стадию кислотного разложения иммунокомплекса и увеличить экспрессность и чувствительность способа определения патогенных микроорганизмов.

Кроме того, создание на поверхности магнитных наночастиц электроактивного полимерного покрытия (полимерного покрытия, модифицированного электроактивными соединениями) приводит к уменьшению поверхностной энергии наночастиц и позволит предотвратить их агрегацию, в результате чего размер частиц не изменяется в течение эксперимента. Таким образом, использование полимерного покрытия позволит добиться высокой чувствительности и воспроизводимости анализа.

Использование магнитных нанокompозитных частиц с электроактивным полимерным покрытием (полимерным покрытием, модифицированным электроактивными соединениями) позволит расширить круг потенциальных электрохимически активных меток

Предложенный способ иммуноанализа позволит существенно снизить материало- и трудозатраты на проведение анализа, увеличить производительность и уменьшить

себестоимость определения.

Таким образом, из патентной и научно-технической литературы не известен способ определения патогенных микроорганизмов заявляемой совокупности признаков.

На фигуре 1 изображен общий вид рабочего электрода, где 1 - подложка из стеклотекстолита, 2 - дорожка из токопроводящего материала (графитовая композиция, углеродные чернила), 3 - слой изолятора или цементита.

На фигуре 2 представлены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в модельных растворах, содержащих (а, 4-5) и не содержащих (б, 4-5) микроорганизмы E.Coli (штамм O-12).

4 - вольтамперограмма фонового электролита, 5 - вольтамперограмма модельного раствора.

На фигуре 3 представлены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в пробах, содержащих (а, 6-7) и не содержащих (б, 6-7) микроорганизмы E.Coli (штамм O-12).

6 - вольтамперограмма фонового электролита, 7 - вольтамперограмма пробы.

На фигуре 4 представлены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в пробах, содержащих (а, 8-9) и не содержащих (б, 8-9) микроорганизмы E.Coli (штамм O-12).

8 - вольтамперограмма фонового электролита, 9 - вольтамперограмма пробы.

На фигуре 5 представлены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в пробах, содержащих (а, 10-11) и не содержащих (б, 10-11) микроорганизмы E.Coli (штамм O-12).

10 - вольтамперограмма фонового электролита, 11 - вольтамперограмма пробы.

На фигуре 6 представлены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в модельных растворах, содержащих (а, 12-13) и не содержащих (б, 12-13) микроорганизмы *Salmonella typhimurium* (штамм SL 7207).

12 - вольтамперограмма фонового электролита, 13 - вольтамперограмма модельного раствора.

На фигуре 7 представлены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в пробах, содержащих (а, 14-15) и не содержащих (б, 14-15) микроорганизмы *Salmonella typhimurium* (штамм SL 7207).

14 - вольтамперограмма фонового электролита, 15 - вольтамперограмма пробы.

Способ иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1.

Вытяжку анализируемой среды (модельного раствора) инкубируют в течение 30 минут с электроактивными магнитными нанокompозитными частицами Fe₃O₄-полипиррол при температуре 37°C. После инкубации несвязавшиеся электроактивные магнитные нанокompозитные частицы отделяют с использованием магнитного поля. В подготовленную таким образом вытяжку помещают ТГЭ (фиг.1), модифицированный антителами против E.Coli (штамм O-12), и выдерживают в течение 20 минут при температуре 37°C. Для ускорения доставки меченых микроорганизмов к поверхности сенсора используют магнитное поле. Затем электрод промывают буферным раствором, содержащим нормальную лошадиную сыворотку (НЛС) и твин-20. Извлеченный из анализируемого раствора электрод помещают в электрохимическую ячейку. В качестве фонового электролита используют раствор KNO₃ в воде. В качестве аналитического сигнала используют электрохимический отклик окисления полипиррольного покрытия электроактивных магнитных нанокompозитных частиц, локализованных в иммунокомплексе на поверхности ТГЭ. Для проведения холостого

опыта используют раствор, не содержащий микроорганизмы E.Coli (штамм O-12) (фиг.2). В модельном растворе обнаружили 5×10^3 клеток/мл микроорганизма E.Coli (штамм O-12).

Пример 2.

Вытяжку анализируемой среды инкубируют в течение 30 минут с электроактивными магнитными нанокompозитными частицами Fe-полипиррол при температуре 37°C. После инкубации несвязавшиеся электроактивные магнитные нанокompозитные частицы отделяют с использованием магнитного поля. В подготовленную таким образом вытяжку помещают ТУЭ (фиг.1), модифицированный антителами против E.Coli (штамм O-12), и выдерживают в течение 20 минут при температуре 37°C. Для ускорения доставки меченых микроорганизмов к поверхности сенсора используют магнитное поле. Затем электрод промывают буферным раствором, содержащим нормальную лошадиную сыворотку (НЛС) и твин-20. Извлеченный из анализируемого раствора электрод помещают в электрохимическую ячейку. В качестве фонового электролита используют 0,1 М раствор KNO_3 в воде. В качестве аналитического сигнала используют электрохимический отклик окисления полипиррольного покрытия электроактивных магнитных нанокompозитных частиц, локализованных в иммунокомплексе на поверхности ТУЭ. Для проведения холостого опыта используют раствор, не содержащий микроорганизмы E.Coli (штамм O-12) (фиг.3). В пробе, взятой у пациента, обнаружили 2×10^4 клеток/мл микроорганизма E.Coli (штамм O-12).

Пример 3.

Вытяжку анализируемой среды инкубируют в течение 30 минут с электроактивными магнитными нанокompозитными частицами Fe_3O_4 -модифицированный ферроценом оксид кремния при температуре 37°C. После инкубации несвязавшиеся электроактивные магнитные нанокompозитные частицы отделяют с использованием магнитного поля. В подготовленную таким образом вытяжку помещают ТГЭ (фиг.1), модифицированный антителами против E.Coli (штамм O-12), и выдерживают в течение 20 минут при температуре 37°C. Для ускорения доставки меченых микроорганизмов к поверхности сенсора используют магнитное поле. Затем электрод промывают буферным раствором, содержащим нормальную лошадиную сыворотку (НЛС) и твин-20. Извлеченный из анализируемого раствора электрод помещают в электрохимическую ячейку. В качестве фонового электролита используют раствор KNO_3 в воде. В качестве аналитического сигнала используют электрохимический отклик окисления ферроценовых групп полимерного покрытия электроактивных магнитных нанокompозитных частиц, локализованных в иммунокомплексе на поверхности ТГЭ. Для проведения холостого опыта используют раствор, не содержащий микроорганизмы E.Coli (штамм O-12) (фиг.2). В пробе, взятой у пациента, обнаружили $1,5 \times 10^3$ клеток/мл микроорганизма E.Coli (штамм O-12).

Пример 4.

Пробу воды инкубируют в течение 30 минут с электроактивными магнитными нанокompозитными частицами Fe_3O_4 -модифицированный ферроценом оксид кремния при температуре 37°C. После инкубации несвязавшиеся электроактивные магнитные нанокompозитные частицы отделяют с использованием магнитного поля. В подготовленную таким образом вытяжку помещают ТУЭ (фиг.1), модифицированный антителами против E.Coli (штамм O-12), и выдерживают в течение 20 минут при температуре 37°C. Для ускорения доставки меченых микроорганизмов к поверхности

сенсора используют магнитное поле. Затем электрод промывают буферным раствором, содержащим нормальную лошадиную сыворотку (НЛС) и твин-20. Извлеченный из анализируемого раствора электрод помещают в электрохимическую ячейку. В качестве фонового электролита используют 0,1 М раствор KNO_3 в воде. В качестве

аналитического сигнала используют электрохимический отклик окисления ферроценовых групп полимерного покрытия электроактивных магнитных нанокompозитных частиц, локализованных в иммунокомплексе на поверхности ТУЭ. Для проведения холостого опыта используют раствор, не содержащий микроорганизмы *E.Coli* (штамм O-12)

(фиг.3). В пробе обнаружили $2,3 \times 10^2$ клеток/мл микроорганизма *E.Coli* (штамм O-12).

Пример 5.

Вытяжку анализируемой среды (модельный раствор) инкубируют в течение 30 минут с электроактивными магнитными нанокompозитными частицами Fe-модифицированный хинолином поливинилбензилхлорид при температуре 37°C . После инкубации

несвязавшиеся электроактивные магнитные нанокompозитные частицы отделяют с использованием магнитного поля. В подготовленную таким образом вытяжку помещают ТГЭ (фиг.1), модифицированный антителами против *Salmonella typhimurium* (штамм SL 7207), и выдерживают в течение 20 минут при температуре 37°C . Для ускорения доставки меченых микроорганизмов к поверхности сенсора используют магнитное поле. Затем

электрод промывают буферным раствором, содержащим нормальную лошадиную сыворотку (НЛС) и твин-20. Извлеченный из анализируемого раствора электрод помещают в электрохимическую ячейку. В качестве фонового электролита используют раствор KNO_3 в воде. В качестве аналитического сигнала используют электрохимический

отклик восстановления хинолиновых групп полимерного покрытия электроактивных магнитных нанокompозитных частиц, локализованных в иммунокомплексе на поверхности ТГЭ. Для проведения холостого опыта используют раствор, не содержащий микроорганизмы *Salmonella typhimurium* (штамм SL 7207) (фиг.2). В модельном растворе обнаружили 6×10^3 клеток/мл микроорганизма *Salmonella typhimurium* (штамм SL 7207).

Пример 6.

Вытяжку анализируемой среды инкубируют в течение 30 минут с электроактивными магнитными нанокompозитными частицами Fe_3O_4 -модифицированный хинолином поливинилбензилхлорид при температуре 37°C . После инкубации несвязавшиеся

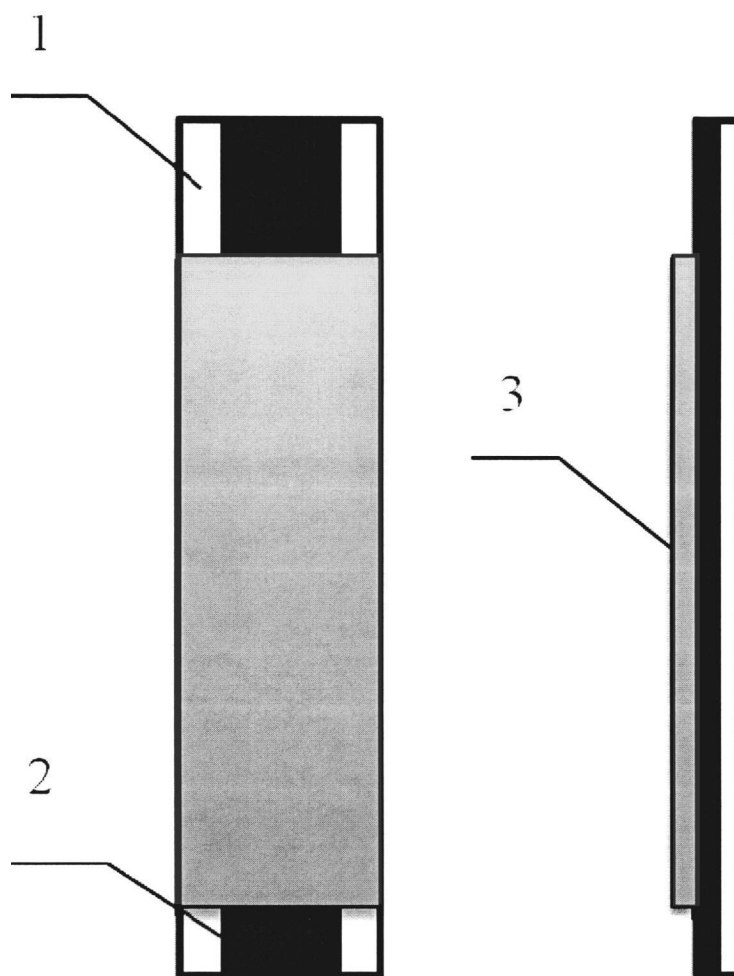
электроактивные магнитные нанокompозитные частицы отделяют с использованием магнитного поля. В подготовленную таким образом вытяжку помещают ТУЭ (фиг.1), модифицированный антителами против *Salmonella typhimurium* (штамм SL 7207), и

выдерживают в течение 20 минут при температуре 37°C . Для ускорения доставки меченых микроорганизмов к поверхности сенсора используют магнитное поле. Затем электрод промывают буферным раствором, содержащим нормальную лошадиную сыворотку (НЛС) и твин-20. Извлеченный из анализируемого раствора электрод помещают в электрохимическую ячейку. В качестве фонового электролита используют раствор KNO_3 в воде. В качестве аналитического сигнала используют электрохимический

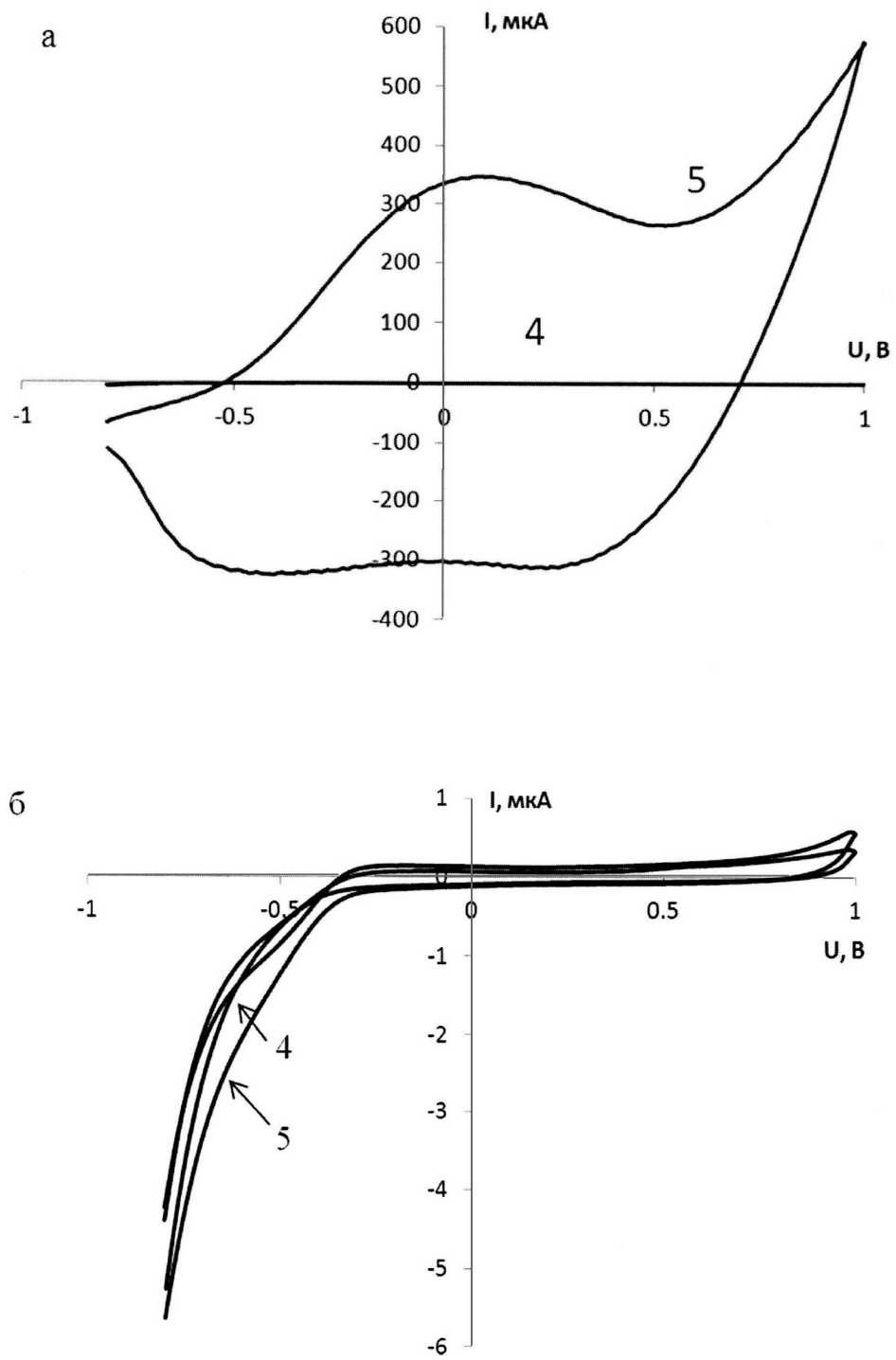
отклик восстановления хинолиновых групп полимерного покрытия электроактивных магнитных нанокompозитных частиц, локализованных в иммунокомплексе на поверхности ТУЭ. Для проведения холостого опыта используют раствор, не содержащий микроорганизмы *Salmonella typhimurium* (штамм SL 7207) (фиг.2). В пробе, взятой у пациента, обнаружили $3,7 \times 10^2$ клеток/мл микроорганизма *Salmonella typhimurium* (штамм SL 7207).

Формула изобретения

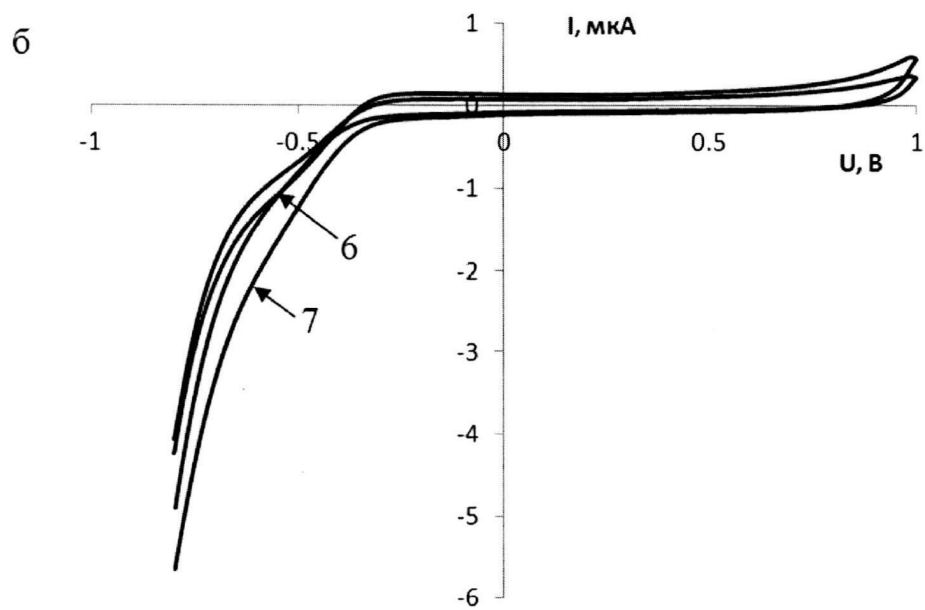
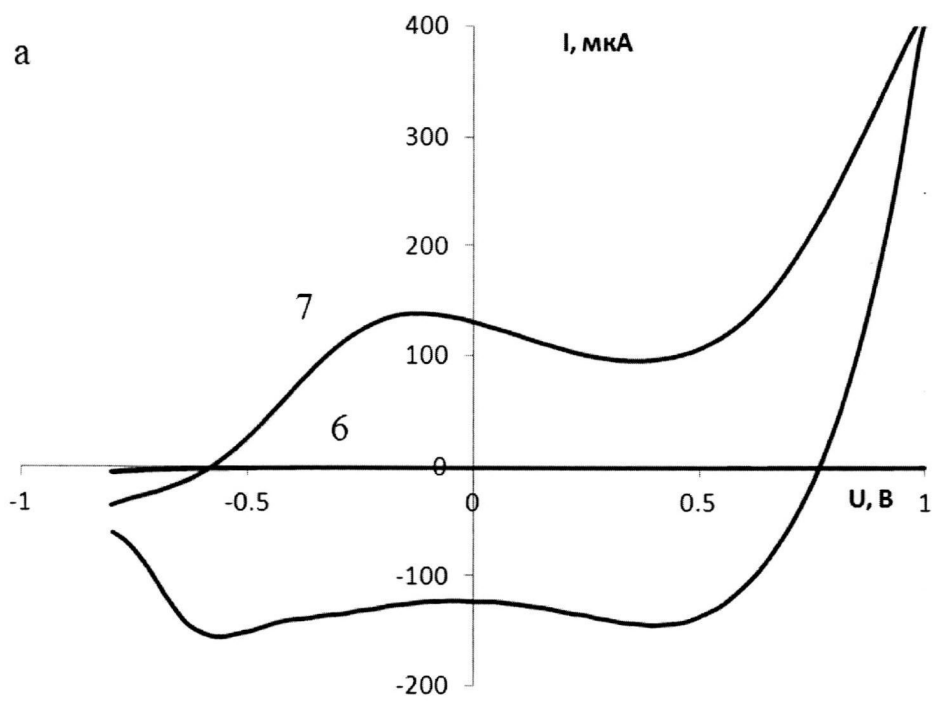
Способ определения содержания грамотрицательных патогенных бактерий в анализируемой среде, характеризующийся конъюгированием бактерий с электрохимической меткой, в качестве которой используют магнитные нанокompозитные частицы на основе Fe, Fe₃O₄ с электроактивным полимерным покрытием из полипиррола, модифицированного хинолином поливинилбензилхлорида либо модифицированного ферроценом оксида кремния, осуществляемым в водной среде в течение 30 минут при температуре 37°С, отделением несвязавшихся нанокompозитных частиц с использованием магнитного поля, помещением в среду рабочего электрода, изготовленного из графитсодержащих материалов, поверхность которого предварительно модифицируют антителами, специфичными к определяемому штамму бактерий, образованием иммунокомплекса на поверхности электрода в течение 20 минут при температуре 37°С с использованием магнитного поля, промыванием электрода буферным раствором, содержащим нормальную лошадиную сыворотку и твин-20, помещением извлеченного из анализируемой среды рабочего электрода в электрохимическую ячейку, содержащую фоновый электролит KNO₃, растворенный в воде, и определением содержания определяемых бактерий по величине аналитического сигнала, в качестве которого используют электрохимический отклик окисления/восстановления нанокompозитных частиц, локализованных в иммунокомплексе на поверхности рабочего электрода.



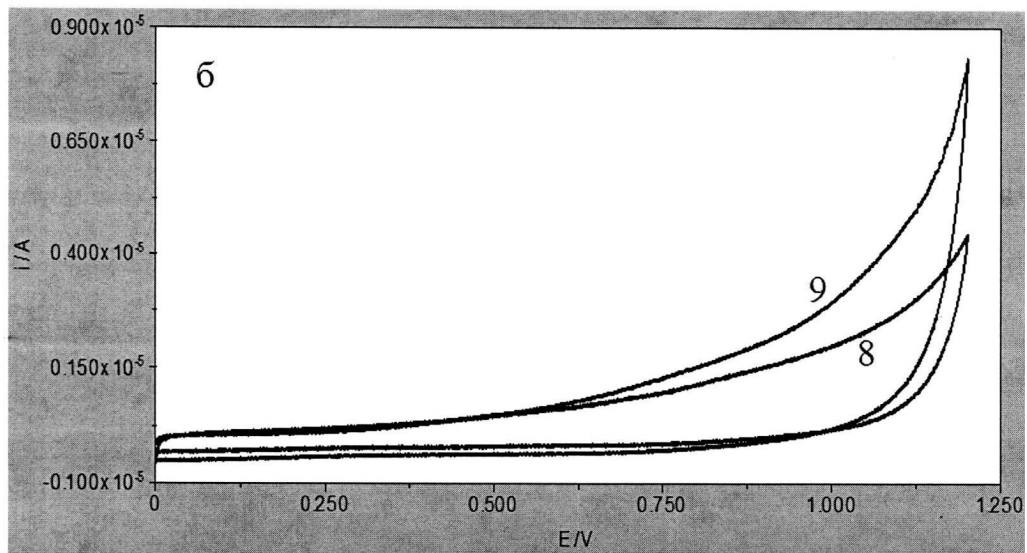
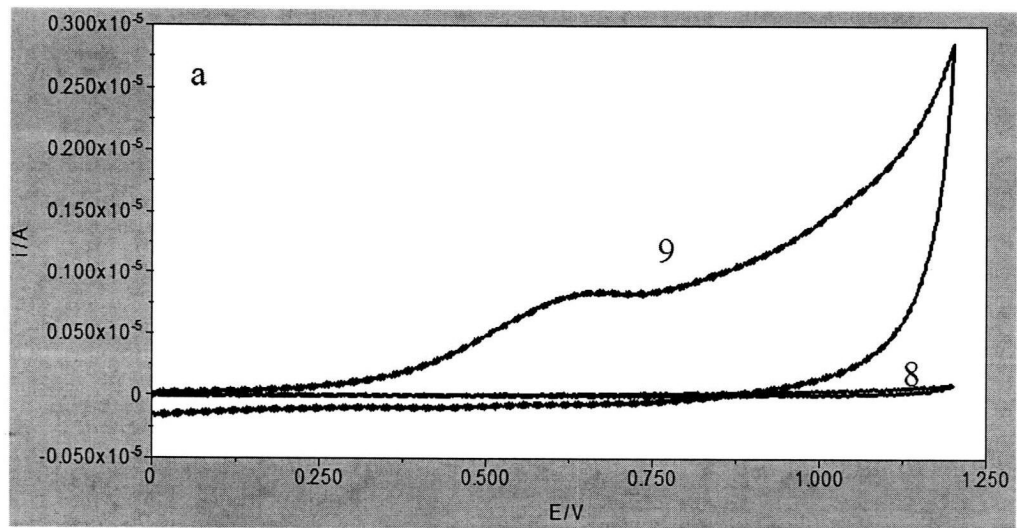
Фиг. 1



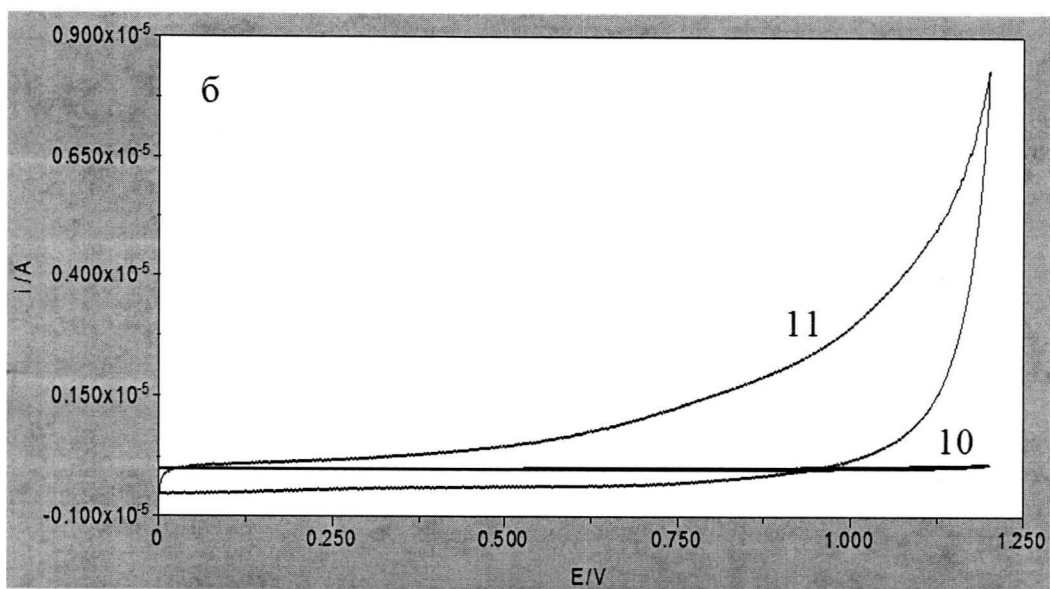
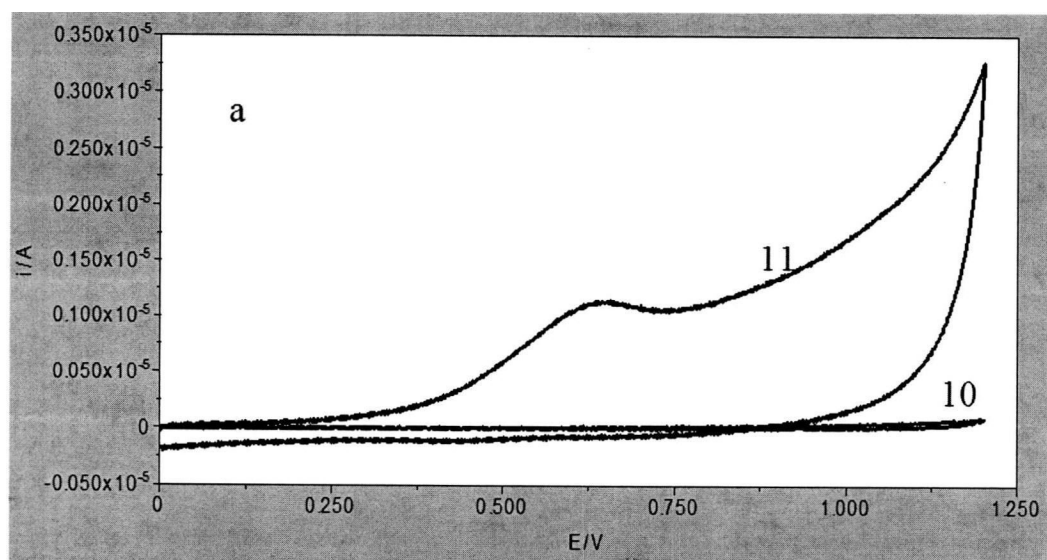
Фиг. 2



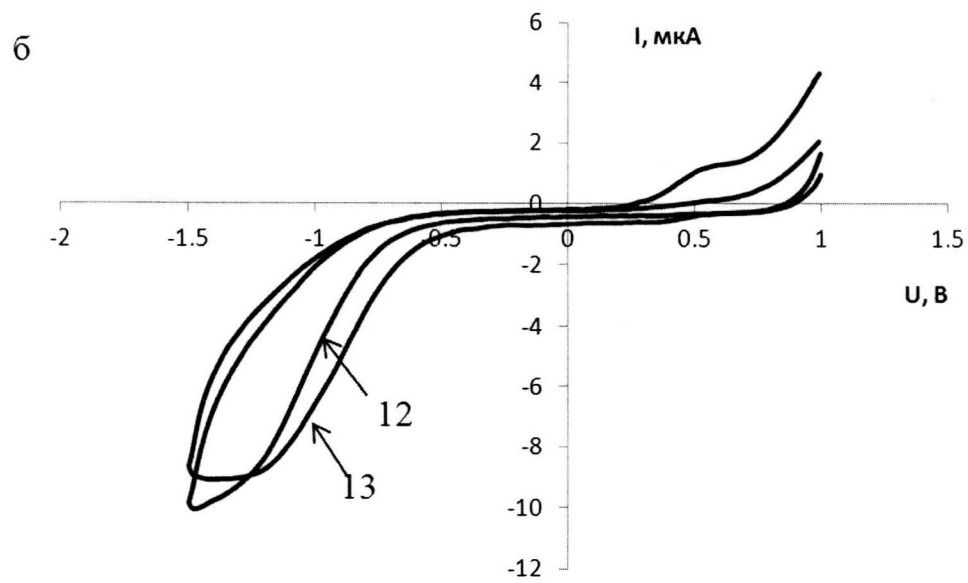
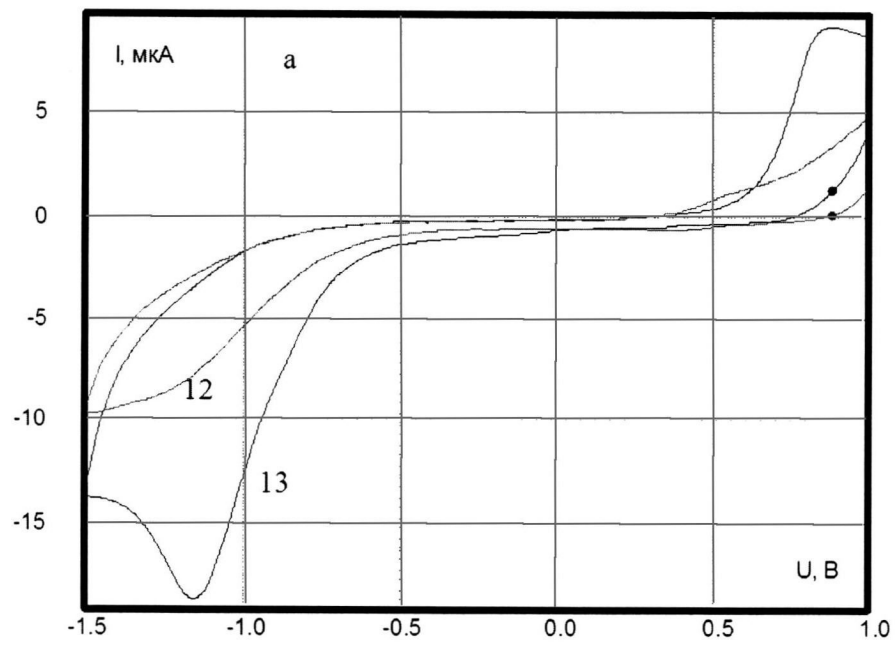
Фиг. 3



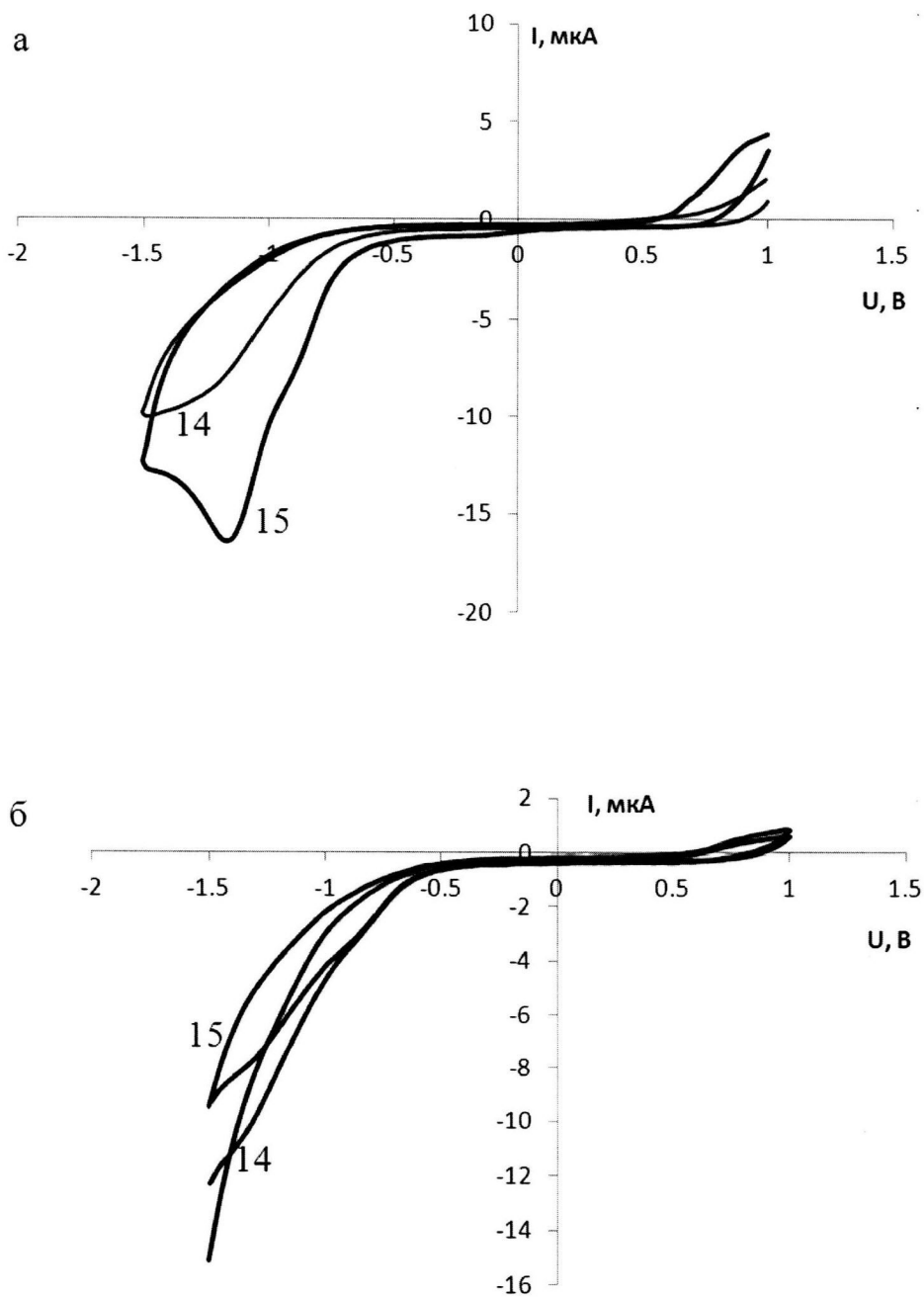
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7